



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

JORDANA SALETE PUTTI

ESTRESSE OXIDATIVO NO CORAÇÃO DE RATOS MACHOS
COM E SEM ATIVIDADE REPRODUTIVA DURANTE O
ENVELHECIMENTO

Orientador: Prof. Dra. Mara da Silveira Benfato

Banca: Dra. Cristiane Matté e Dr. Jorge Alberto Quillfeldt

Periódico de referência: Experimental Gerontology

Porto Alegre, Julho de 2014

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, primeiramente àqueles que sempre me apoiaram para que fosse possível chegar até aqui, minha família, meus pais e meus irmãos. O apoio de vocês foi fundamental para que eu pudesse superar os obstáculos que surgiram ao longo desta caminhada.

A minha orientadora, Mara da Silveira Benfato pelas tantas oportunidades que me forneceu, por todo apoio e atenção fornecidos diariamente.

A todos aqueles que de uma forma ou outra me fizeram crescer ao longo destes anos acadêmicos, em especial o pessoal do Laboratório 204 do Departamento de Biofísica, que além de colegas são amigos e foram muito importantes tanto para o desenvolvimento desse trabalho, mas também para meu crescimento enquanto pessoa.

Aos meus amigos, em especial os que me acompanham desde o início da faculdade e estiveram sempre presentes: Bianca, Daniela, Mariê, Natália, Irina e Paula.

Agradeço a banca que aceitou o convite e se disponibilizou a engrandecer meu trabalho com boas ideias, Dra. Cristiane Matté e Dr. Jorge Alberto Quillfeldt.

À UFRGS, pelo ensino de excelência e pelas muitas experiências vividas; aos órgãos de fomento pelo auxílio financeiro, em especial ao CNPq.

Por fim, agradeço a todos que de uma forma ou outro me fizeram chegar até aqui!

Índice:

Lista de abreviaturas.....	4
Título.....	5
Resumo.....	5
Palavras-chave.....	5
Introdução.....	6
Material e Métodos.....	7
Resultados.....	10
Discussão.....	12
Referências.....	16
Tabelas.....	21
Figuras.....	24

Lista de abreviaturas

BSA: albumina sérica bovina

CAT: catalase

DNA: ácido desoxinucleico

DTNB: ácido ditiobis nitrobenzóico

ERs: espécies reativas

ERN: espécies reativas de nitrogênio

ERO: espécies reativas de oxigênio

GPx: glutathione peroxidase

GSH: glutathione total

GST: glutathione S-transferase

HPLC cromatografia líquida de alto desempenho

KCL: cloreto de potássio

MDA: malondialdeído

NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila

SOD: superóxido dismutase

VIT. C: vitamina C

Estresse oxidativo no coração de ratos machos com e sem atividade reprodutiva durante o envelhecimento

Jordana Putti^{a,*}, Fernanda Heemann^a, Mélang Natuane^a, Tiago B. Solomon^a, Ártur Schuller^a, Vanessa Engers^a, Priscila Machado^a, Mara S. Benfato^a

^a Laboratório de Estresse Oxidativo, Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, Brasil.

* Autor correspondente; E-mail: jojo.jsp@gmail.com

Resumo

A reprodução modifica a fisiologia e o metabolismo do sexo masculino. Esse estudo analisou o estresse oxidativo no coração de ratos machos com e sem atividade reprodutiva durante o envelhecimento. O estresse oxidativo foi avaliado através da medida da atividade de antioxidantes enzimáticos: catalase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase e glutathione-S-transferase; antioxidantes não enzimáticos: níveis de vitamina C e glutathione; e através da medida de danos: peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e nitritos e nitratos. Também foi feita medida dos níveis de testosterona no soro. Animais reprodutores exibiram maiores níveis de carbonilação de proteínas e nitritos e nitratos, a peroxidação lipídica foi maior em animais não reprodutores. A atividade dos antioxidantes enzimáticos foi bastante diversa: a glutathione S-transferase foi maior em animais não reprodutores de 24 meses, a superóxido dismutase foi maior nos animais reprodutores de 12 meses; a glutathione peroxidase foi maior nos animais reprodutores de 6 meses, ao passo que a catalase foi maior nos não reprodutores dessa mesma idade. Nos antioxidantes não enzimáticos, a vitamina C foi maior em animais reprodutores de 3 e 24 meses e a glutathione em reprodutores de 24 meses. A medida do hormônio testosterona se mostrou elevada em animais com atividade reprodutiva de 3 e 6 meses em comparação com as demais idades e com os animais sem essa atividade. Os resultados desse estudo adicionam dados que auxiliam na compreensão das mudanças dos parâmetros de estresse oxidativo nos processos de envelhecimento e reprodução.

Palavras-chave: coração, defesas antioxidantes, envelhecimento, estresse oxidativo, reprodução

1. Introdução

Diferentes processos metabólicos demandam uma grande quantidade de energia dos organismos vivos. A reprodução é o processo que requer a maior demanda energética na vida dos mamíferos (Garratt et al., 2011). Em vertebrados machos, ela é responsável por mudanças morfológicas, comportamentais e físicas (Miles et al., 2007). Estudos demonstram que o esforço metabólico elevado que está associado com a reprodução aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN) (Bergeron et al., 2011).

As espécies reativas escapam normalmente de processos metabólicos, como a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e a produção delas desempenha um papel fundamental de grande importância em vários processos metabólicos, como sinalização celular, fagocitose, incluindo a própria atividade reprodutora. Entretanto, um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas e defesas antioxidantes pode levar ao estresse oxidativo, o qual pode causar dano em biomoléculas, como modificações proteicas, peroxidação lipídica, inativação de enzimas e até mesmo dano ao DNA (Guevara et al., 2009; Herlein et al., 2009; Halliwell e Gutteridge, 2007).

O envelhecimento, bem como os danos causados pelas ERs é comumente combatido pelos mecanismos de defesas antioxidantes. Essas defesas podem ser tanto enzimáticas como não enzimáticas. Dentre as defesas enzimáticas podemos destacar a superóxido dismutase (SOD), a glutathione S-transferase (GST), a glutathione peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e as peroxirredoxinas. Os principais antioxidantes não enzimáticos são a glutathione e a vitamina C (Vit C) (Adibhatla e Hatcher, 2010; Vina et al., 2003; Yoshihara et al., 2010).

Atualmente, existe uma grande quantidade de teorias que tentam explicar o processo de envelhecimento (Kirkwood, 2008; Rattan, 2006). Uma dessas teorias, que está entre as mais aceitas é a teoria dos radicais livres. Ela postula que o fenômeno do envelhecimento é modificado por fatores genéticos e ambientais e pode ser considerado o resultado do acúmulo de lesões moleculares causadas por espécies reativas, levando à perda da função celular e a doenças com o aumento da idade (Harman, 1956).

O aparelho cardiovascular é o sistema modular primário do corpo humano, tendo como órgão principal o coração, o qual sofre uma série de mudanças ao longo do curso da vida (Burggren e Reyna, 2011). Embora ocorram muitas alterações funcionais durante a vida, o coração é o primeiro órgão a revelar sinais significativos de envelhecimento entre todos

os outros no corpo humano (Holmes, 2008). Além disso, o avanço da idade está associado com o aumento da incidência de doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, hipertensão e uma diminuição da qualidade de vida geral (Holmes, 2008; Lloyd-Jones et al., 2004).

Há poucos trabalhos que associam o estresse oxidativo com o processo de reprodução em conjunto com o envelhecimento em machos, especialmente no coração. Já foi demonstrado previamente pelo nosso laboratório que o envelhecimento e a reprodução alteram o perfil oxidativo em cérebro, pulmão, rim e gônadas de ratos machos (Alabarse et al., 2011; Gil Alabarse et al., 2011; Hackenhaar et al., 2009; Salomon et al., 2013). Então, este estudo tem por objetivo estabelecer um perfil oxidativo do coração de ratos machos Wistar e sua relação com o processo de senescência e a atividade reprodutora. A fim de elucidar as alterações que ocorrem nesse órgão no decorrer do envelhecimento, foi comparado tanto em ratos reprodutores, como em não reprodutores, a atividade de antioxidantes enzimáticos, os níveis de antioxidantes não enzimáticos e o dano causado pelas ERs.

2. Material e Métodos

2.1. Animais e órgãos

Este estudo utilizou 80 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), de 3, 6, 12 e 24 meses de idade. Com um mês de idade os animais foram separados em 2 grupos: reprodutores e não reprodutores (n=10 para cada idade). Os ratos reprodutores foram mantidos em uma caixa, com uma única fêmea, de mesma idade (1 macho e 1 fêmea por caixa). Os animais não reprodutores foram agrupados em 5 por caixa, sem qualquer contato com fêmeas.

Quando as fêmeas deram à luz as ninhadas, foi considerada a ocorrência de reprodução. Os filhotes foram separados dos casais com 21 dias de idade, antes do estágio de puberdade. O tamanho das ninhadas variou de 5 a 11 filhotes e cada casal teve mais de uma ninhada. Os animais foram mantidos em um ciclo de claro/escuro de 12 horas a 24 ± 1 °C, os mesmos eram alimentados com ração padrão de laboratório e água potável *ad libitum*.

Os animais foram eutanasiados, de acordo com protocolo experimental, assim que alcançavam 3, 6, 12 e 24 meses de idade. Todos os animais foram anestesiados

usando uma mistura de quetamina e xilazina (75 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente). Foi medido o peso do corpo e o comprimento dos animais (sem a cauda). Após perfusão utilizando-se solução salina, os órgãos foram removidos, pesados e congelados em nitrogênio líquido.

O coração dos animais foi processado por maceração manual para análise. As amostras foram sonicadas em solução tampão (30 mmol/L fosfato, 120 mmol/L KCl, 100 mmol/L PMSF, pH 7.4) e centrifugadas por 10 minutos a 3.500x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado por 10 minutos a 15.800x g. O sobrenadante da segunda centrifugação foi utilizado para os ensaios.

Este estudo foi conduzido com aprovação do comitê de ética da UFRGS.

2.2. Ensaios

2.2.1. Níveis de testosterona

O nível de testosterona no soro foi estimado por radioimunoensaio usando Testosterone RIA DSL-4100® kits (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Oxford, UK). Todos os ensaios foram realizados de forma independente em triplicata.

2.2.2. Antioxidantes enzimáticos

A atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi avaliada pela medida da oxidação do NADPH (usando absorbância a 340nm) na presença de glutathione reduzida, glutathione redutase e hidroperóxido de terc-butil (Pinto e Bartley, 1969). A atividade da GPx foi expressa em U/mg de proteína; 1 U foi definida como a capacidade da enzima de oxidar 1 µmol de NADPH/min.

O consumo do peróxido de hidrogênio, que é uma medida das atividades da catalase, glutathione peroxidase e peroxirredoxinas (Halliwell e Gutteridge, 2007; Rhee et al., 2003) foi avaliado através da medida da taxa de consumo de peróxido de hidrogênio via absorbância a 240 nm (Aebi, 1984). A atividade foi expressa em U/mg de proteína, onde 1 U foi definida como a capacidade de consumir 1 µmol de peróxido de hidrogênio/min.

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi medida através da reação catalisada por GST do 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno com glutathione reduzida a uma absorbância de 340 nm (Tsuchida, 2001). A atividade foi expressa em U/mg de proteína; 1 U foi definida como a capacidade da enzima de produzir 1 μ mol de GS-DNB/min.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi baseada em um método espectrofotométrico que monitora a inibição da autooxidação da epinefrina utilizando absorbância a 480 nm (Misra e Fridovic.I, 1972). A atividade da SOD foi expressa em U/mg de proteína, onde 1 U foi definida como a capacidade da enzima de inibir 50% da autooxidação da epinefrina.

2.2.3. Antioxidantes não enzimáticos

A medida da glutathione total (GSHt) foi realizada através da formação de p-nitrofenol do ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) na presença da enzima glutathione redutase e NADPH. A formação de cor foi medida em espectrofotômetro a uma absorbância de 412 nm (Kondo and Awada, 2000).

Os níveis de Vitamina C (Vit. C) foram medidos em HPLC, empregando uma coluna de fase reversa (SUPERCOSILTM LC-18-DB HPLC (15 cm x 4.6 mm, 5 μ m)), onde foi utilizado uma fase móvel (30 mmol/L Fosfato de Potássio monobásico (pH 3,6) e metanol em uma proporção de 9:1, v/v) com fluxo de 1 mL/min, e 20 μ L de amostra. A absorbância do eluente da coluna foi monitorada a 250 nm (Karatepe, 2004).

2.2.4. Dano oxidativo

Como um índice de danos em proteínas, foi medido o nível de carbonil, utilizando uma absorbância de 370 nm (Levine et al., 1990). O nível de carbonil foi expresso como nmol de carbonil/g de proteína.

Como um índice de peroxidação lipídica, foi medido o nível de malondialdeído (MDA) em HPLC, simultaneamente com o ensaio de Vit. C. (Karatepe, 2004). Os níveis de MDA foram expressos em nmol de MDA/mg de proteína.

Como um índice indireto dos níveis de óxido nítrico (nitritos e nitratos – NO₂ e NO₃) foi empregado um método espectrofotométrico utilizando a solução de Griess, que

usa absorbância a 543 nm para determinar os níveis totais de nitritos e nitratos (Grisham et al., 1996).

2.2.5. Normalização dos dados

Todos os resultados foram normalizados pelo conteúdo total de proteínas, utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão (Bradford, 1976). Todos os ensaios foram realizados de forma independente em triplicata.

2.3. Análise estatística

A análise estatística foi feita com auxílio do Núcleo de Assessoria Estatística (NAE) da UFRGS. Os resultados foram analisados utilizando-se o teste ANOVA de duas vias com *post hoc* de Bonferroni. Em variáveis cujo teste de Levene rejeitou a hipótese de homogeneidade de variâncias, foi realizada a análise de variâncias ponderadas pelo inverso da variância de cada grupo. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

3. Resultados

3.1. Peso e comprimento dos animais e órgãos

Os pesos corporais e o comprimento (sem cauda) dos animais com idade de três, seis, doze e vinte quatro meses não diferem entre animais do mesmo grupo, nem entre os grupos. Os níveis de testosterona foram maiores nos animais reprodutores de 3 e 6 meses de idade em relação aos não reprodutores. Dentro do grupo dos reprodutores, os animais de 3 e 6 meses diferiram significativamente dos animais de 12 e 24 meses. Nos animais não reprodutores não houve diferença entre as idades (Tabela 1).

3.2. Dano oxidativo

A carbonilação de proteínas foi maior nos animais reprodutores de 6, 12 e 24 meses com relação aos animais não reprodutores. Dentre os animais reprodutores, a carbonilação foi maior aos 12 meses com relação às demais idades. Entre os não

reprodutores, o dano foi significativamente maior nos animais de 3 meses de idade com relação a todos os demais (Tabela 2).

Pode-se observar uma diferença significativa nos níveis de nitritos e nitratos nas idades de 3 e 24 meses entre animais reprodutores e não reprodutores, onde os maiores níveis foram encontrados nos animais com atividade reprodutiva. Durante o envelhecimento, dentre os reprodutores, os animais de 24 meses foram os que apresentaram os maiores níveis de NO_2 e NO_3 com relação às demais idades, enquanto os animais de 12 meses foram os que apresentaram os valores significativamente mais baixos. Entre os não reprodutores, os animais de 24 meses também foram os que apresentaram maiores níveis de NO_2 e NO_3 , ao passo que, nesse grupo, os menores níveis foram encontrados nos animais de 3 meses de idade (Tabela 2).

Os níveis de MDA foram maiores nos animais não reprodutores, com relação aos reprodutores nas idades de 6, 12 e 24 meses. Durante o envelhecimento, os níveis de MDA foram maiores nos animais reprodutores de 6 meses e menor nos de 12 meses em relação aos demais, já nos não reprodutores, os maiores níveis foram encontrados nos animais de 24 meses quando comparados aos demais (Tabela 2).

3.3. Antioxidantes enzimáticos

O consumo de peróxido de hidrogênio, quando comparados os animais reprodutores e os não reprodutores, diferiu significativamente nas idades de 3 e 6 meses, onde reprodutores tiveram maior consumo de peróxido de hidrogênio aos 3 meses e menor aos 6, com relação aos animais não reprodutores. Durante o envelhecimento, nos animais reprodutores, não houve diferença significativa entre as idades. Nos reprodutores, o consumo foi maior nos animais de 6 meses de idade em relação aos demais (Figura 1).

Os níveis de SOD foram maiores nos animais reprodutores de 6 e 12 meses com relação aos não reprodutores. Dentro do grupo reprodutor, todas as idades demonstraram diferença significativa nos níveis de SOD, com aumento progressivo de atividade de 3 para 6 e 12 meses e queda aos 24. Nos animais não reprodutores, apenas os de 12 meses demonstraram aumento significativo de atividade em relação aos de 3 meses (Figura 2).

Entre os animais reprodutores e não reprodutores, a atividade da GPx diferiu nas idades de 6 e 24 meses. Dentro do grupo reprodutor, a atividade da GPx diferiu significativamente em todas as idades, sendo maior aos 6 meses. Nos não reprodutores, a atividade dessa enzima foi menor nos animais de 3 meses com relação aos demais (Figura 3).

A atividade da GST foi maior nas idades de 6 e 12 meses dos animais não reprodutores em comparação com os reprodutores. Dentro do grupo reprodutor, a atividade da GST foi elevada nas idades de 3 e 24 meses, com relação às idades de 6 e 12 meses. Nos animais não reprodutores, a atividade da GST foi menor nos animais de 3 meses de idade com relação aos animais de 24 meses (Figura 4).

3.4. Antioxidantes não enzimáticos

Os níveis de vitamina C diferiram significativamente em todas as idades na comparação entre os animais reprodutores e não reprodutores. Entre os reprodutores, os níveis foram maiores em animais de 3 e 24 meses com relação aos animais de 6 e 12 meses; e entre os não reprodutores, nos animais de 6 meses em relação a todos os demais (Figura 5).

A glutathiona diferiu entre os grupos apenas na idade de 12 meses, apresentando maior nível nos animais não reprodutores. Dentre os animais reprodutores, se mostrou elevada aos 24 meses com relação às demais idades. Dentre os não reprodutores, foi significativamente menor nos animais de 3 meses com relação aos demais animais (Figura 6).

4. Discussão

Os resultados encontrados nesse trabalho demonstram que existe uma significativa diferença no perfil oxidativo de ratos machos que possuem atividade reprodutiva e os que não possuem. As diferenças observadas corroboram com a idéia de que a reprodução altera os parâmetros de estresse oxidativo no coração de ratos machos. Durante o envelhecimento, houve um aumento significativo de alguns parâmetros em idades específicas e acentuada diferença no nível de dano encontrado em animais reprodutores e não reprodutores.

Uma consequência fisiológica da reprodução, com impactos negativos na história de vida dos indivíduos, é o estresse oxidativo. Esse estresse pode causar dano

oxidativo extensivo em proteínas, lipídios e mesmo ao DNA (Garratt et al., 2011). Os resultados encontrados neste trabalho demonstram que os animais reprodutores apresentam dano em proteínas elevado em relação aos não reprodutores de 6, 12 e 24 meses (Tabela 2). Tais resultados vão de acordo com trabalhos que mostram que o coração é um órgão que apresenta relativa abundância de proteínas modificadas devido ao acúmulo de ROS, principalmente da cadeia transportadora de elétrons e que os danos são acentuados com o processo de envelhecimento, pois, com o decorrer do tempo, há um declínio nas funções mitocondriais (Choksi et al., 2008; Petrosillo et al., 2009).

O aumento dos níveis de MDA (Tabela 2) também vai de encontro com trabalhos que já demonstraram que o aumento da peroxidação lipídica, no coração, está associado com o envelhecimento (Miro et al., 2000). Os animais reprodutores apresentam maiores níveis de NO_2 e NO_3 (Tabela 2). É sabido que o óxido nítrico pode induzir dano ao DNA, especialmente através de modificações de bases e inibição de proteínas com grupos tiol (Niles et al., 2006). O que se pode observar é que os animais apresentam considerável aumento de nitritos e nitratos com o decorrer do tempo, onde os maiores níveis são encontrados em animais de 24 meses em ambas as idades. Como esses níveis são uma medida indireta do óxido nítrico, pode-se inferir que aos 24 meses de idade há um aumento considerável de dano nos animais, principalmente nos com atividade reprodutiva. Esse resultado corrobora com o fato de que no coração, o óxido nítrico está associado com um aumento de EROs e fisiopatologias (Valko, 2006).

A SOD consome ânions superóxido e evita a formação de peroxinitrito (Halliwell e Gutteridge, 2007). Perante os resultados deste estudo, observou-se que os níveis de SOD foram aumentando progressivamente nos animais de 3, 6 e 12 meses, havendo um decréscimo aos 24 meses. Pode-se notar, portanto, que aos 24 meses os animais estão mais suscetíveis aos danos causados principalmente pelo ânion superóxido (Figura 2).

O produto da enzima SOD é o H_2O_2 , que é claramente tóxico e deve ser removido rapidamente dos organismos. Em células de mamíferos, esta eliminação é feita principalmente pelas peroxirredoxinas, pela glutathione peroxidase e a catalase; ambas reduzem o peróxido de hidrogênio à água e oxigênio (Davies, 2000; Sies, 2014). Neste trabalho, o consumo de peróxido de hidrogênio foi maior aos 6 meses de idade em ratos reprodutores e menor nos não reprodutores desta mesma idade (Figura 1),

indicando que há uma diferença no metabolismo de detoxificação do peróxido de hidrogênio entre animais reprodutores e não reprodutores, principalmente na idade de 6 meses.

Outro resultado que segue este padrão de diferenças é o da GPx. Novamente, entre os animais reprodutores, o nível dessa enzima foi acentuadamente maior nos animais de 6 meses de idade, indicando que nessa idade há um maior requerimento dessa enzima (Figura 3). Nos animais não reprodutores os níveis foram menores aos 3 meses, mas nas idades seguintes aumentaram e mantiveram-se constantes. Há, portanto, um padrão que indica o aumento do consumo de peróxido de hidrogênio e assim das enzimas catalase e GPx em animais com atividade reprodutiva de 6 meses de idade.

A GST pode ser ativada reversivelmente por nitrosilação e irreversivelmente por nitratação. Os mecanismos pelos quais o óxido nítrico aumenta a produção de GST envolvem peroxinitrito e/ou nitrosoglutathione (Imaizumi et al., 2006; Musci et al., 2006). Os resultados encontrados nesse trabalho demonstram que o aumento da GST está diretamente relacionado com o aumento dos níveis de NO_2 e NO_3 , especialmente nos animais de 24 meses, sejam eles reprodutores ou não (Figura 4). Já se sabe que baixos níveis de GST refletem numa maior suscetibilidade de doenças cardiovasculares (Zhou, 2014). Estes resultados vão de acordo com resultados anteriores encontrados pelo nosso laboratório que também demonstraram um aumento de GST em rins de ratos machos e fêmeas de 24 meses e no cérebro de machos reprodutores dessa mesma idade (Alabarse et al., 2011; da Silva et al., 2013; Gil Alabarse et al., 2011).

A vitamina C é conhecida por ser um antioxidante essencial e cofator enzimático de reações fisiológicas, tais como a produção de hormônios, síntese de colágeno, e resposta imune. Naturalmente, a insuficiência de vit. C leva a lesões graves a múltiplos órgãos, especialmente o coração, uma vez que ele é altamente aeróbio e, conseqüentemente, produz mais ROS (Englard e Seifter, 1986). Ao contrário do que ocorre em primatas, os ratos são capazes de sintetizar vit. C, processo que ocorre no fígado desses animais (Gupta et al., 1973). Neste trabalho, os níveis de vitamina C dos animais reprodutores diferiram significativamente dos não reprodutores em todas as idades, sendo maior aos 3 e 24 e menor aos 6 e 12 meses. Tais resultados demonstram que os animais reprodutores tem maior aporte nas idades iniciais e finais, ao passo que os não reprodutores tem o ápice do nível de vit. C aos 6 meses de idade (Figura 5).

Esses resultados corroboram com estudos anteriores que demonstram o papel da vitamina C na proteção contra danos induzidos pelas espécies reativas e previne o desenvolvimento de doenças cardíacas (Kim, 2013).

A glutathione é um antioxidante celular essencial. Ela é utilizada para uma ampla gama de funções, incluindo eliminação de peróxidos e metabolismo de xenobióticos (Zhou et al., 2014). Neste estudo, pode-se observar que o nível de GSH, entre os animais reprodutores, foi maior aos 24 meses, o que indica que há uma maior mobilização desse antioxidante no metabolismo dos animais de idade mais avançada. Nos animais não reprodutores, o mesmo pode ser observado: os animais de 24 meses são os que apresentam os maiores níveis desse antioxidante, ao passo que os menores níveis foram encontrados nos animais de 3 meses (Figura 6). Tais resultados vão de acordo com a literatura que demonstra que há maior concentração desse antioxidante em ratos de idade mais avançada, principalmente como forma de combater disfunção do miocárdio (Leichtweis, 2001).

A testosterona é um pró-oxidante e aumenta o estresse oxidativo nos diferentes órgãos (Halliwell e Gutteridge, 2007), provavelmente aumentando o metabolismo e, assim, reduzindo o tempo de vida de indivíduos do sexo masculino. Esta hipótese é apoiada pela constatação de que ratos machos castrados vivem mais do que ratos machos intactos (Buchanan et al., 2001; Wikelski et al., 1999). No entanto, é necessário certo nível de testosterona para as defesas antioxidantes normais do organismo, e as diferenças de concentração desse hormônio podem alterar os parâmetros de estresse oxidativo (Alonso-Alvarez et al., 2007; Ikeda et al., 2009). Neste trabalho, pode-se notar claramente que os animais com atividade reprodutiva mantiveram um alto nível desse hormônio nas idades de 3 e 6 meses e tiveram um decréscimo significativo nas idades seguintes, enquanto os animais sem atividade reprodutiva mantiveram seu nível de testosterona equilibrado durante todo o ciclo de vida (Tabela 1).

É importante ressaltar que o coração é um órgão vital, com alta demanda metabólica, rico em mitocôndrias e, portanto, especialmente vulnerável ao dano oxidativo. Atualmente, já é amplamente comprovado que o estresse oxidativo induzido por ROS desempenha um papel em várias doenças cardiovasculares, tais como: aterosclerose, doença isquêmica do coração, hipertensão, cardiomiopatias, hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca congestiva (Dai e Rabinovitch, 2009; Perry et al.,

2013; Seddon et al., 2007). Cada órgão de um organismo possui sua própria capacidade antioxidante. Por conseguinte, cada órgão também pode ter uma capacidade única para ativação de antioxidantes, por isso se faz tão importante um aprofundamento no estudo do perfil de estresse oxidativo e defesas antioxidantes nos mais distintos órgãos.

A partir dos resultados encontrados nesse trabalho é possível evidenciar que há diferença no perfil de estresse oxidativo e defesas antioxidantes no coração de ratos machos durante seu envelhecimento. Essas diferenças podem se acentuar quando analisamos o aspecto reprodutivo desses animais e o grau em que essas mudanças levam a mudanças na expectativa de vida e qualidade de vida destes animais precisa ser melhor esclarecido.

Referências

Adibhatla, R. M., and J. F. Hatcher, 2010, Lipid Oxidation and Peroxidation in CNS Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities: Antioxidants & Redox Signaling, v. 12, p. 125-169.

Aebi, H., 1984, Catalase invitro: Methods in Enzymology, v. 105, p. 121-126.

Alabarse, P. V. G., T. B. Salomon, T. M. Medeiros, F. S. Hackenhaar, A. K. Schueller, G. Ehrenbrink, and M. S. Benfato, 2011, Oxidative stress in the kidney of reproductive male rats during aging: Experimental Gerontology, v. 46, p. 773-780.

Alonso-Alvarez, C., S. Bertrand, B. Faivre, O. Chastel, and G. Sorci, 2007, Testosterone and oxidative stress: the oxidation handicap hypothesis: Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, v. 274, p. 819-825.

Buchanan, K. L., M. R. Evans, A. R. Goldsmith, D. M. Bryant, and L. V. Rowe, 2001, Testosterone influences basal metabolic rate in male house sparrows: a new cost of dominance signalling?: Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, v. 268, p. 1337-1344.

Bergeron, P., V. Careau, M. M. Humphries, D. Reale, J. R. Speakman, and D. Garant, 2011, The energetic and oxidative costs of reproduction in a free-ranging rodent: Functional Ecology, v. 25, p. 1063-1071.

Bradford, M. M., 1976, Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding: Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254.

Burggren, W. W., and K. S. Reyna, 2011, Developmental trajectories, critical windows and phenotypic alteration during cardio-respiratory development: Respiratory Physiology & Neurobiology, v. 178, p. 13-21.

Choksi, K. B., J. E. Nuss, J. H. DeFord, and J. Papaconstantinou, 2008, Age-related alterations in oxidatively damaged proteins of mouse skeletal muscle mitochondrial electron transport chain complexes: *Free Radical Biology and Medicine*, v. 45, p. 826-838.

da Silva, A. C. A., T. B. Salomon, C. S. Behling, J. Putti, F. S. Hackenhaar, P. V. G. Alabarse, A. K. Schueller, and M. S. Benfato, 2013, Oxidative stress in the kidney of reproductive female rats during aging: *Biogerontology*, v. 14, p. 411-422.

Dai, D.-F., and P. S. Rabinovitch, 2009, Cardiac Aging in Mice and Humans: The Role of Mitochondrial Oxidative Stress: *Trends in Cardiovascular Medicine*, v. 19, p. 213-220.

Davies, K. J. A., 2000, Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems: *Iubmb Life*, v. 50, p. 279-289.

Englard, S., and S. Seifter, 1986, The biochemical functions of ascorbic-acid: *Annual Review of Nutrition*, v. 6, p. 365-406.

Garratt, M., A. Vasilaki, P. Stockley, F. McArdle, M. Jackson, and J. L. Hurst, 2011, Is oxidative stress a physiological cost of reproduction? An experimental test in house mice: *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, v. 278, p. 1098-1106.

Gil Alabarse, P. V., F. S. Hackenhaar, T. M. Medeiros, M. F. Almeida Mendes, P. R. Viacava, A. K. Schueller, T. B. Salomon, G. Ehrenbrink, and M. S. Benfato, 2011, Oxidative stress in the brain of reproductive male rats during aging: *Experimental Gerontology*, v. 46, p. 241-248.

Grisham, M. B., G. G. Johnson, and J. R. Lancaster, 1996, Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids: Nitric Oxide, Pt a - Sources and Detection of No; No Synthase, v. 268, p. 237-246.

Guevara, R., F. M. Santandreu, A. Valle, M. Gianotti, J. Oliver, and P. Roca, 2009, Sex-dependent differences in aged rat brain mitochondrial function and oxidative stress: *Free Radical Biology and Medicine*, v. 46, p. 169-175.

Gupta, S. D., Choudhur.Pk, and Chatterj.Ib, 1973, Synthesis of l-ascorbic-acid from d-glucurono-1,4-lactone conjugates by different species of animals: *International Journal of Biochemistry*, v. 4, p. 309-314.

Hackenhaar, F. S., T. B. Salomon, P. V. Gil Alabarse, G. Ehrenbrink, and M. S. Benfato, 2009, Pulmonary antioxidant defences and protein damage during the ageing process of both sexes: *Cell Biochemistry and Function*, v. 27, p. 378-382.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Fourth ed. Oxford University Press, New York

- Harman, D.**, 1956, Aging - A theory based on free-radical and radiation-chemistry: Journals of Gerontology, v. 11, p. 298-300.
- Herlein, J. A., B. D. Fink, Y. O'Malley, and W. I. Sivitz**, 2009, Superoxide and Respiratory Coupling in Mitochondria of Insulin-Deficient Diabetic Rats: Endocrinology, v. 150, p. 46-55.
- Holmes, D. J.**, 2008, The biology of human longevity inflammation, nutrition, and aging in the evolution of lifespans: Science, v. 319, p. 1044-1045.
- Ikeda, Y., K.-i. Aihara, S. Yoshida, T. Sato, S. Yagi, T. Iwase, Y. Sumitomo, T. Ise, K. Ishikawa, H. Azuma, M. Akaike, S. Kato, and T. Matsumoto**, 2009, Androgen-Androgen Receptor System Protects against Angiotensin II-Induced Vascular Remodeling: Endocrinology, v. 150, p. 2857-2864.
- Imaizumi, N., S. Miyagi, and Y. Aniya**, 2006, Reactive nitrogen species derived activation of rat liver microsomal glutathione S-transferase: Life Sciences, v. 78, p. 2998-3006.
- Karatepe, M.**, 2004, Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV: Lc Gc North America, p. 104-106.
- Kirkwood, T.B.L.**, 2008. Understanding ageing from an evolutionary perspective. J. Intern.Med. 263, 117–127.
- Kondo, T., Awada, F.**, 2000. Glutathione (oxidized and reduced form): assay mixture and measurement. In: Taniguchi, N., Gutteridge, J.M.C. (Eds.), Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species. Oxford University Press, Oxford, pp. 57–60.
- Levine, R. L., D. Garland, C. N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A. G. Lenz, B. W. Ahn, S. Shaltiel, and E. R. Stadtman**, 1990, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins: Methods in Enzymology, v. 186, p. 464-478.
- Lloyd-Jones, D. M., T. J. Wang, E. P. Leip, M. G. Larson, D. Levy, R. S. Vasan, R. B. D'Agostino, J. M. Massaro, A. Beiser, P. A. Wolf, and E. J. Benjamin**, 2004, Lifetime risk for development of atrial fibrillation - The Framingham Heart Study: Circulation, v. 110, p. 1042-1046.
- Miles, D. B., B. Sinervo, L. C. Hazard, E. I. Svensson, and D. Costa**, 2007, Relating endocrinology, physiology and behaviour using species with alternative mating strategies: Functional Ecology, v. 21, p. 653-665.
- Miro, O., J. Casademont, E. Casals, M. Perea, A. Urbano-Marquez, P. Rustin, and F. Cardellach**, 2000, Aging is associated with increased lipid peroxidation in human hearts, but not with mitochondrial respiratory chain enzyme defects: Cardiovascular Research, v. 47, p. 624-631.

Misra, H. P., and Fridovic, I., 1972, Role of superoxide anion in autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase: *Journal of Biological Chemistry*, v. 247, p. 317.

Musci, G., T. Persichini, M. Casadei, V. Mazzone, G. Venturini, F. Polticelli, and M. Colasanti, 2006, Nitrosative/oxidative modifications and ageing: Mechanisms of Ageing and Development, v. 127, p. 544-551.

Niles, J. C., J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum, 2006, Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: Structures and mechanisms of product formation: *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, v. 14, p. 109-121.

Perry, C. N., S. Han, S. D. Clegg, K. Ouyang, D. Deacon, J. Chen, Q. Gong, Z. Zhou, N. C. Chi, and E. D. Adler, 2013, Oxidative-stress Mediates Apoptosis in a Human Model of Danon Disease and Heart Failure: *Circulation Research*, v. 113.

Petrosillo, G., M. Matera, N. Moro, F. M. Ruggiero, and G. Paradies, 2009, Mitochondrial complex I dysfunction in rat heart with aging: critical role of reactive oxygen species and cardiolipin: *Free Radical Biology and Medicine*, v. 46, p. 88-94.

Pinto, R. E., and W. Bartley, 1969, Effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates: *Biochemical Journal*, v. 112, p. 109-&.

Rattan, S.I.S., 2006. Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals. *Free Radic. Res.* 40, 1230–1238.

Rhee SG, Chang TS, Bae YS, Lee SR, Kang SW, 2003. Cellular regulation by hydrogen peroxide. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14: S211-S215

Salomon, T. B., F. S. Hackenhaar, A. C. Almeida, A. K. Schueller, P. V. Gil Alabarse, G. Ehrenbrink, and M. S. Benfato, 2013, Oxidative stress in testis of animals during aging with and without reproductive activity: *Experimental Gerontology*, v. 48, p. 940-946.

Seddon, M., Y. H. Looi, and A. M. Shah, 2007, Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure: *Heart*, v. 93, p. 903-907.

Sies, H., 2014, Role of Metabolic H₂O₂ Generation: *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, p. 8735-8741.

Wikelski, M., S. Lynn, C. Breuner, J. C. Wingfield, and G. J. Kenagy, 1999, Energy metabolism, testosterone and corticosterone in white-crowned sparrows: *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology*, v. 185, p. 463-470.

Tsuchida, S., 2001, Regulation of glutathione transferase expression and function in stress response: *Seikagaku*, v. 73, p. 89-92.

Yoshihara, D., N. Fujiwara, and K. Suzuki, 2010, Antioxidants: Benefits and risks for long-term health: *Maturitas*, v. 67, p. 103-107.

Zhou, Y., D. E. Harrison, K. Love-Myers, Y. Chen, A. Grider, K. Wickwire, J. R. Burgess, M. A. Stochelski, and R. Pazdro, 2014, Genetic analysis of tissue glutathione concentrations and redox balance: *Free Radical Biology and Medicine*, v. 71, p. 157-164.

Tabela 1

Peso dos animais, comprimento do corpo (sem a cauda) e níveis de testosterona (no soro) de ratos machos de 3, 6, 12 e 24 meses com e sem atividade reprodutiva. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

		Idades ^a			
		3	6	12	24
Peso^b	R	339,54 \pm 40,43	397,27 \pm 59,13	468,37 \pm 42,63	421,97 \pm 26,97
	NR	296,82 \pm 3,30	310,51 \pm 7,10	433,01 \pm 24,62	436,71 \pm 36,81
Comprimento^c	R	21,81 \pm 1,60	22,27 \pm 1,19	23,78 \pm 1,40	24,00 \pm 0,81
	NR	20,22 \pm 0,21	22,02 \pm 0,40	22,50 \pm 0,30	22,03 \pm 0,30
Testosterona^d	R	18,58 \pm 4,31* #	15,14 \pm 4,65* #	2,68 \pm 1,35	1,92 \pm 1,07
	NR	2,03 \pm 1,63	1,20 \pm 0,15	1,61 \pm 0,93	1,42 \pm 0,39

^a Idade expressa em meses.

^b Peso dos animais em g.

^c Comprimento dos animais em cm.

^d Níveis de testosterona expressos em ng/ml.

* Denota diferença significativa entre os animais reprodutores e os não reprodutores para um $p \leq 0,05$.

Denota diferença entre as idades dos animais do mesmo grupo para um $p \leq 0,05$.

Tabela 2

Carbonilação de proteínas (carbonil), dano indireto por óxido nítrico (NO₂ e NO₃) e peroxidação lipídica (MDA), em coração de ratos de 3, 6, 12 e 24 meses com e sem atividade reprodutiva. Resultados expressos em média ± erro padrão.

		Idades ^a			
		3	6	12	24
CARBONIL^b	R	1,85 ± 0,54	3,73 ± 1,6 *	2,49 ± 5,81 * #	1,44 ± 2,38 *
	NR	1,85 ± 0,54 #	0,17 ± 0,03	0,23 ± 0,08	0,77 ± 0,59
NO₂ e NO₃^c	R	188,32 ± 0,75 *	156,81 ± 0,75	111,12 ± 0,75 #	476,33 ± 0,84 *#
	NR	28,98 ± 0,075 #	77,80 ± 0,075	106,77 ± 0,084	138,34 ± 0,097 #
MDA^d	R	142,61 ± 32,33	776,98 ± 40,72 * #	72,15 ± 14,722 * #	338,84 ± 15,347 *
	NR	183,40 ± 05,35	470,84 ± 41,11	510,50 ± 70,46	1134,53 ± 72,70 #

^a Idade expressa em meses.

^b Níveis de carbonilação de proteína expressos em nmol de carbonil/g de proteína.

^c Níveis de NO₂ e NO₃ expressos em nmol de NaNO₂/mg de proteína.

^d Níveis de peroxidação lipídica expressos em nmol de MDA/mg de proteína.

* Denota diferença significativa entre os animais reprodutores e os não reprodutores para um $p \leq 0,05$.

Denota diferença entre as idades dos animais do mesmo grupo para um $p \leq 0,05$.

Fig. 1. Consumo de H_2O_2 em coração de animais reprodutores e não reprodutores de 3, 6, 12, 24 meses.

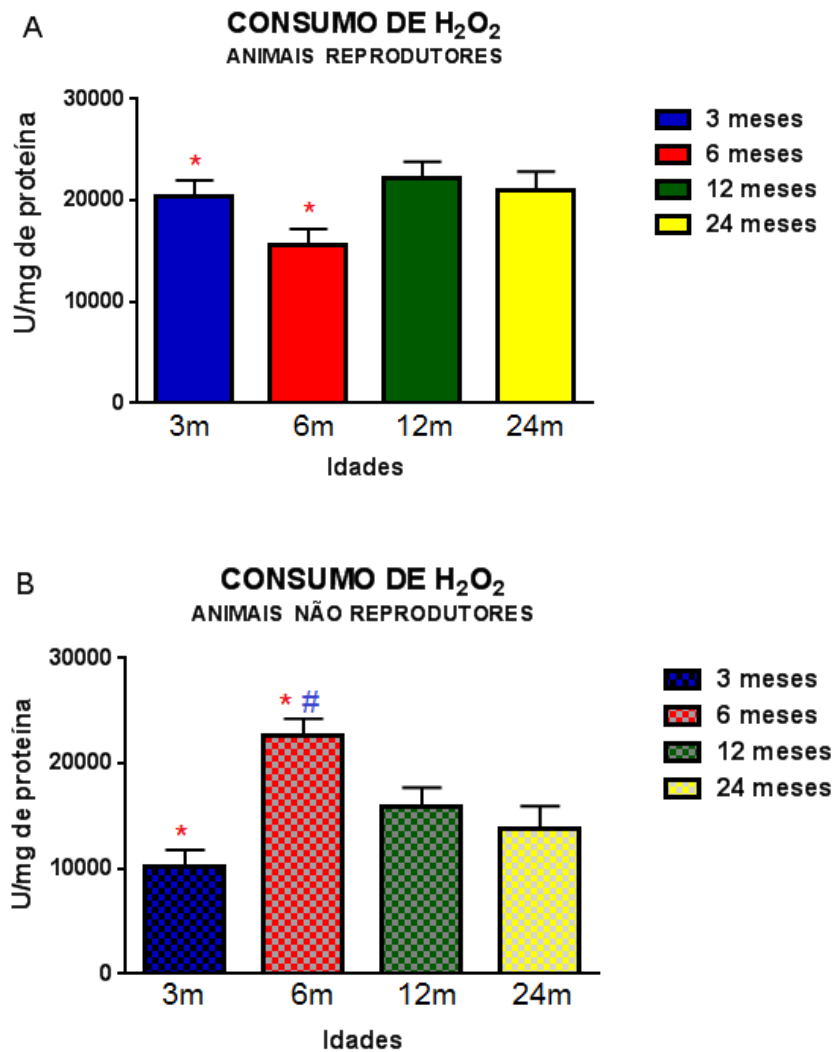


Fig. 1. Consumo de H_2O_2 no coração de ratos reprodutores (A) e não reprodutores (B). Resultados expressos em média \pm erro padrão. * Denota diferença significativa entre os animais reprodutores e os não reprodutores e # denota diferença entre as idades dos animais do mesmo grupo para um $p \leq 0,05$.

Fig. 2. SOD em coração de animais reprodutores e não reprodutores de 3, 6, 12, 24 meses.

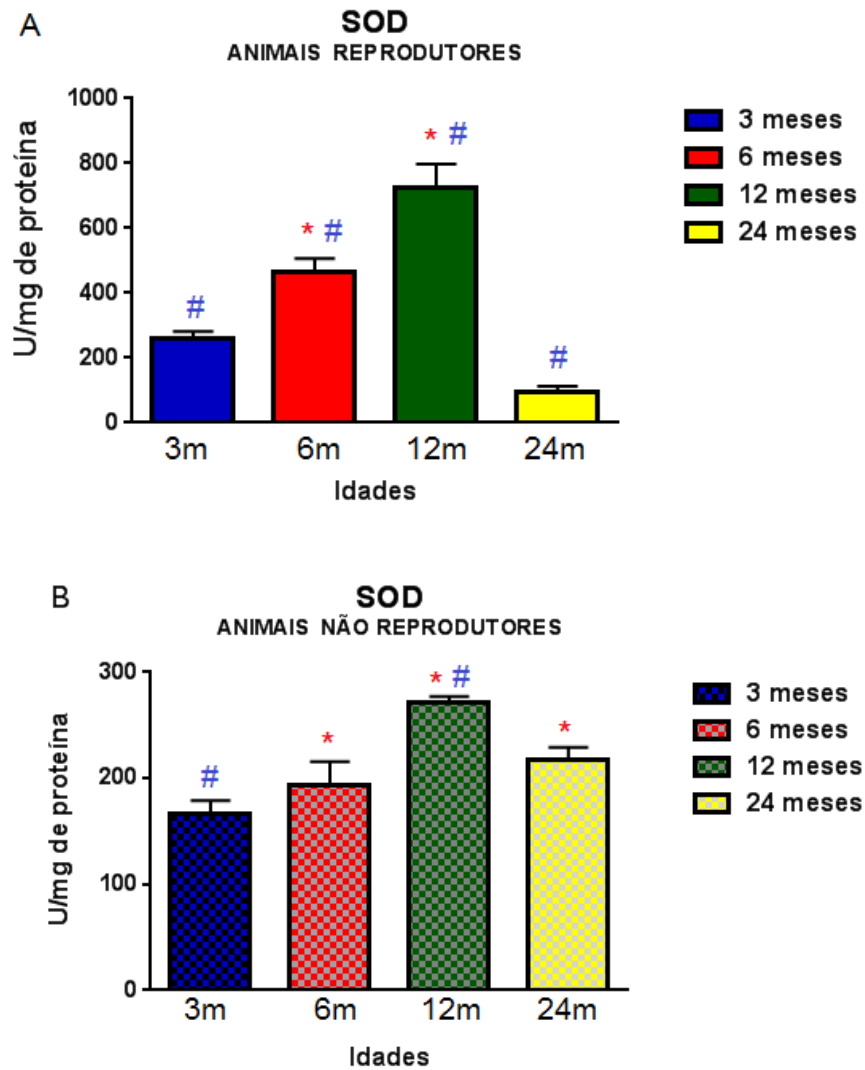


Fig. 2. Atividade da SOD no coração de ratos reprodutores (A) e não reprodutores (B). Resultados expressos em média \pm erro padrão. * Denota diferença significativa entre os animais reprodutores e os não reprodutores e # denota diferença entre as idades dos animais do mesmo grupo para um $p \leq 0,05$.

Fig. 3. GPx em coração de animais reprodutores e não reprodutores de 3, 6, 12, 24 meses.

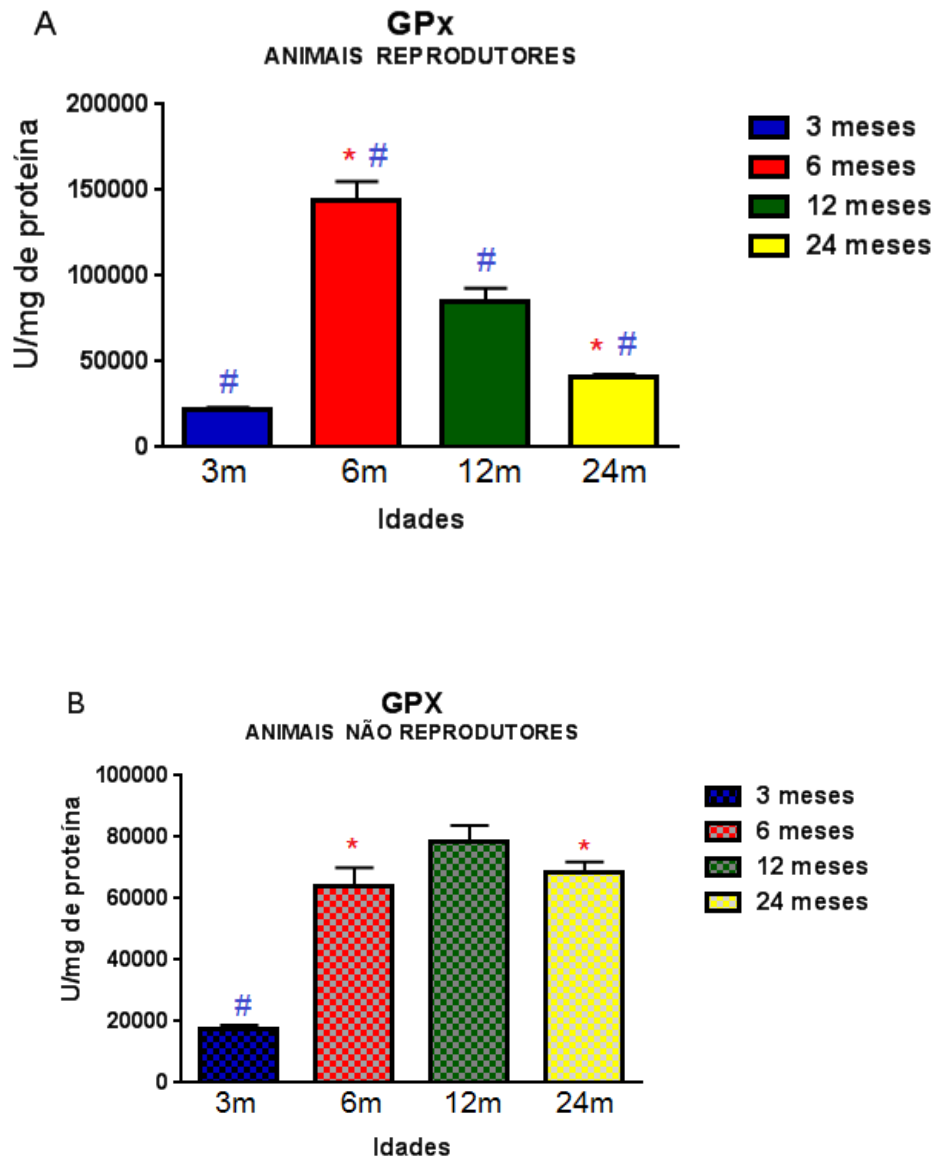


Fig. 3. Atividade da GPx no coração de ratos reprodutores (A) e não reprodutores (B). Resultados expressos em média \pm erro padrão. * Denota diferença significativa entre os animais reprodutores e os não reprodutores e # denota diferença entre as idades dos animais do mesmo grupo para um $p \leq 0,05$.

Fig. 4. GST em coração de animais reprodutores e não reprodutores de 3, 6, 12, 24 meses.

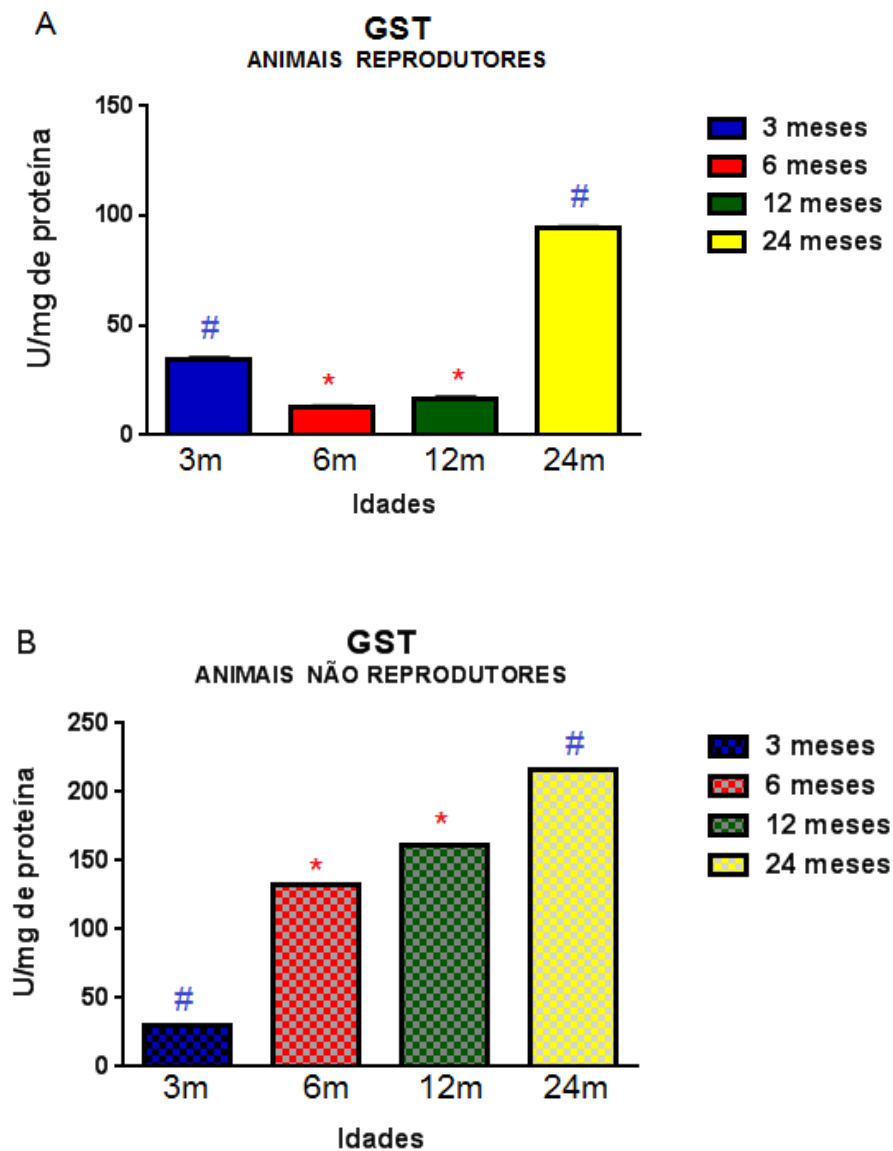


Fig. 4. Atividade da GST no coração de ratos reprodutores (A) e não reprodutores (B). Resultados expressos em média \pm erro padrão. * Denota diferença significativa entre os animais reprodutores e os não reprodutores e # denota diferença entre as idades dos animais do mesmo grupo para um $p \leq 0,05$.

Fig. 5. Vitamina C em coração de animais reprodutores e não reprodutores de 3, 6, 12, 24 meses.

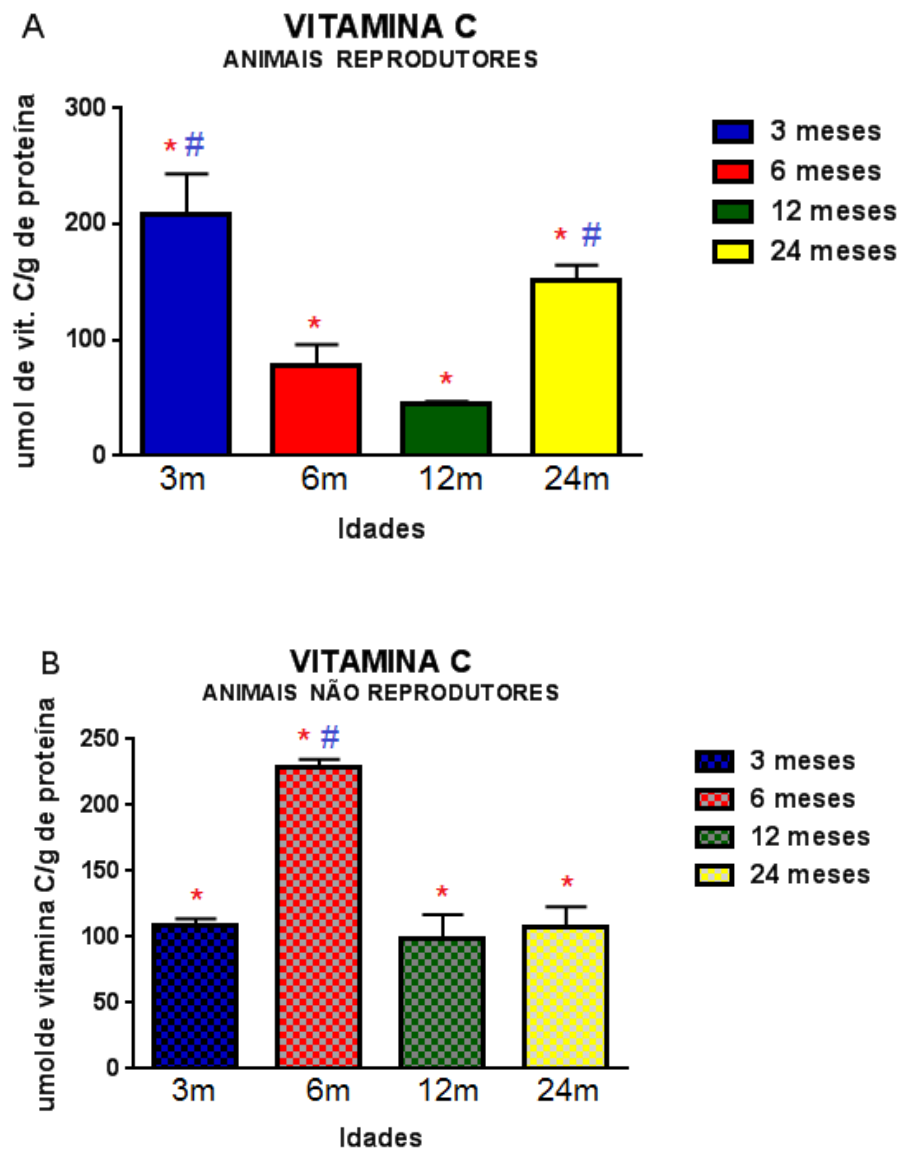


Fig. 5. Níveis de vitamina C no coração de ratos reprodutores (A) e não reprodutores (B). Resultados expressos em média \pm erro padrão. * Denota diferença significativa entre os animais reprodutores e os não reprodutores e # denota diferença entre as idades dos animais do mesmo grupo para um $p \leq 0,05$.

Fig. 6. GSH em coração de animais reprodutores e não reprodutores de 3, 6, 12, 24 meses.

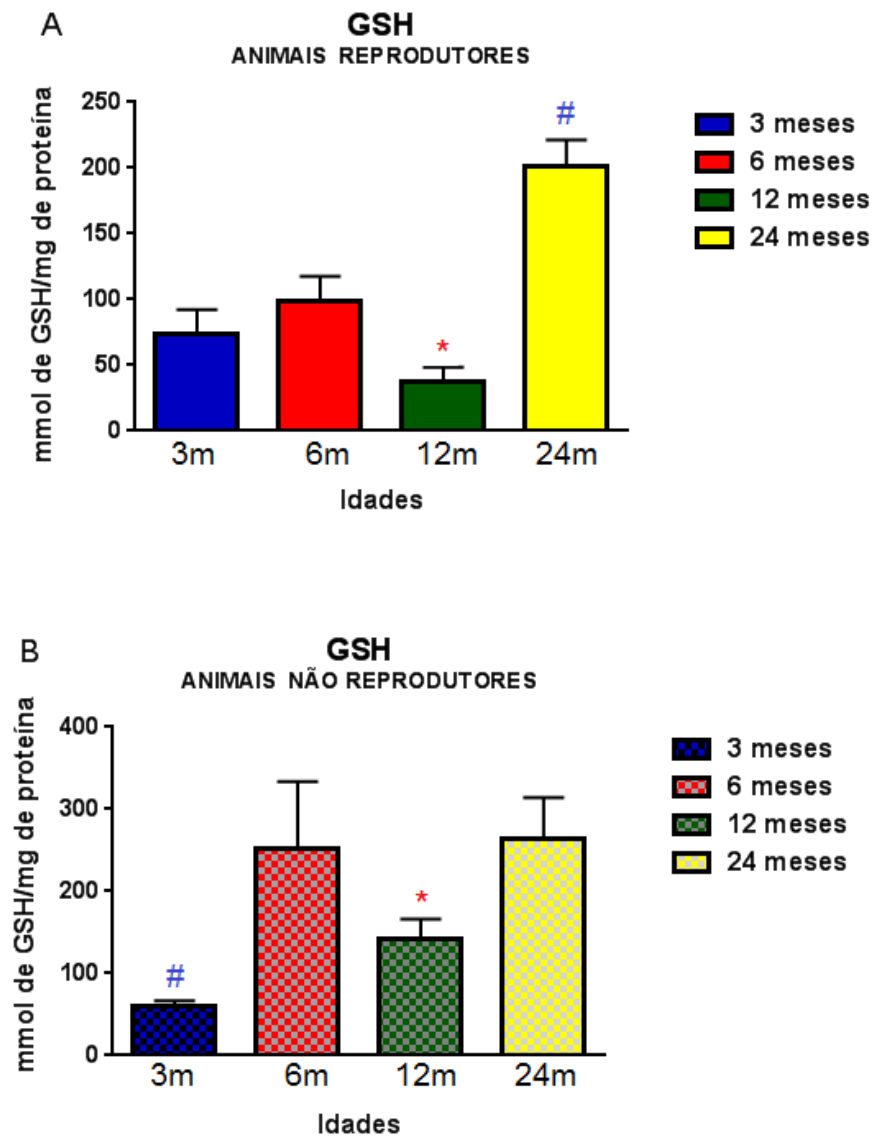


Fig. 6. Atividade da GSH no coração de ratos reprodutores (A) e não reprodutores (B). Resultados expressos em média \pm erro padrão. * Denota diferença significativa entre os animais reprodutores e os não reprodutores e # denota diferença entre as idades dos animais do mesmo grupo para um $p \leq 0,05$.